

---

Rezumatul tezei de doctorat

# Noi factori implicați în astrocitoza reactivă

---

Doctorand **Alexandru Tatomir**

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Fior-Dafin Mureșanu**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Scleroza multiplă ca prototip al bolilor inflamatorii demielinizante</b>	19
1.1. Introducere	19
1.2. Epidemiologie și factori de risc	19
1.2.1. Vitamina D	20
1.2.2. Virusul Epstein-Barr	21
1.2.3. Fumatul	22
1.2.4. Obezitatea la adolescenți	23
1.2.5. Susceptibilitatea genetică	24
1.3. Diagnosticul SM	24
1.4. Patogeneza SM	26
1.4.1. Rolul celulelor T	26
1.4.2. Rolul celulelor B	27
1.4.3. Rolul macrofagelor și al microgliei	28
1.4.4. Rolul astrocitului	29
1.4.5. Rolul sistemului complement	29
1.5. Caracteristicile histopatologice ale leziunilor din SM	31
1.5.1. Leziunile pre-active și difuze	31
1.5.2. Leziunile active	31
1.5.3. Leziunile mixte active/inactive	32
1.5.4. Leziunile inactive	32
1.5.5. Remielinizarea în leziunile din SM	33
<b>2. Rolul astrocitului în patogeneza SM</b>	35
2.1. Aspecte celulare și funcționale ale diversității astrocitare	35
2.1.1. Heterogenitatea astrocitelor normale	35
2.1.2. Fiziologia normală a astrocitelor	36
2.1.2.1. Rolul astrocitelor în dezvoltarea SNC și sinaptogeneză	36
2.1.2.2. Homeostazia hidro-electrolitică și a neurotransmițătorilor	36

2.1.2.3. Formarea barierei hemato-encefalice și regularea fluxului sangvin	36
2.1.2.4. Suport energetic, metabolic și neurotrofic	37
2.2. Astrocitul reactiv	37
2.2.1. Heterogenitatea astrocitelor reactive	37
2.2.1.1. Astrocitele reactive proliferative vs. neproliferative	38
2.2.1.2. Astrocitele A1 vs. A2	38
2.2.2. Efectele nocive ale astrogliozei reactive	39
2.2.2.1. Distrugerea BHE	39
2.2.2.2. Recrutarea celulelor inflamatorii	39
2.2.2.3. Neurotoxicitatea	40
2.2.2.4. Degradarea mielinei și eșecul remielinizării	41
2.2.3. Efectele benefice ale astrogliozei reactive	42
2.2.3.1. Inhibarea invaziei SNC de către celulele inflamatorii	42
2.2.3.2. Efectele antioxidante	43
2.2.3.3. Efectele imunomodulatorii	44
2.2.3.4. Remielinizarea și neuroprotecția	44
<b>3. Rolul patogenetic al Response Gene to Complement (RGC)-32</b>	47
3.1. Rolurile fiziologice și patofiziologice ale RGC-32	47
3.2. RGC-32 și sistemul imunitar	47
3.3. Rolul RGC-32 în SM și encefalomielita experimentală autoimună	49
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru și obiective</b>	53
<b>2. Metodologia generală</b>	55
<b>3. Studiul 1 - RGC-32 reglează generarea astrocitelor reactive în timpul fazei acute a encefalomielitei experimentale autoimune</b>	57
3.1. Raționament și ipoteză	57
3.2. Materiale și metode	57
3.3. Rezultate	61
3.4. Discuții	76
<b>4. Studiul 2 - RGC-32 acționează ca un nod molecular și reglează modificările transcriptomice asociate cu dezvoltarea astrocitelor și astrocitoza reactivă</b>	81
4.1. Raționament și ipoteză	81
4.2. Materiale și metode	81

4.3. Rezultate	84
4.4. Discuții	100
<b>5. Studiul 3 - RGC-32 ca posibilă verigă lipsă în astrogligeneză</b>	<b>103</b>
5.1. Raționament și ipoteză	103
5.2. Materiale și metode	103
5.3. Rezultate	105
5.4. Discuții	111
<b>6. Concluzii și direcții de viitor</b>	<b>115</b>
<b>7. Originalitatea tezei și contribuția științifică</b>	<b>119</b>
<b>REFERINȚE</b>	<b>121</b>

**Cuvinte-cheie:** RGC-32, scleroza multiplă, encefalomielita experimentală autoimună, astrocitoza reactivă, GFAP, vimentină, FABP7, glia radială, astrogligeneză, secvențierea ARN de ultimă generație.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

**Response Gene to Complement (RGC)-32** a fost identificată pentru prima dată în oligodendrocitele (OLG) de șobolan ca o genă indusă de fracțiunea subclitică a căii terminale de activare a complementului C5b-9. Ulterior, s-a constatat că RGC-32 reglează ciclul celular în mai multe tipuri de celule, cum ar fi celulele endoteliale și celulele musculare netede, și contribuie la procese celulare cruciale în fibroză, angiogeneză, oncogeneză și metastaze, inclusiv tranziția epitelial-mezenchimală indusă de factorul de creștere transformant beta (TGF- $\beta$ ).

**Astrocitele** joacă un rol fundamental în funcționarea normală a neuronilor și în menținerea unui mediu neuronal sănătos. Astrocitele reglează mai multe procese fiziologice necesare pentru homeostazia sistemului nervos central (SNC), inclusiv sinaptogeneza, schimbarea și eliminarea neurotransmițătorilor din spațiul sinaptic, reglarea echilibrului ionic și al apei, formarea și menținerea barierei hemato-encefalice (BHE). Astrocitele sunt recunoscute în prezent ca fiind contribuitori critici la patogeneza diferitelor boli ale SNC datorită capacității lor de a suferi modificări morfologice și moleculare complexe ca răspuns la leziunile SNC, un proces numit **astrocitoză reactivă**. Astrocitele reactive interacționează cu alte celule gliale și cu celulele inflamatorii pentru a coordona evoluția leziunii, fie spre recuperarea și rezolvarea inflamației, fie spre progresie și leziuni permanente, într-un echilibru relativ delicat care depinde de regiune, timp și context.

Astrocitele reactive au primit o atenție deosebită ca actori importanți în

patogeneza **sclerozei multiple (SM)**, o boală cronică, autoinflamatorie și demielinizantă a SNC și a **encefalomielitei autoimune experimentale (EAE)**, un model animal de SM. Mai multe studii au arătat că astrocitele reactive joacă un rol important în inițierea și progresia bolii prin capacitatea lor de a atrage celulele inflamatorii în SNC prin secreția de citokine și chemokine. În plus, astrocitele reactive produc specii reactive toxice de azot și oxigen, iar acest mediu proinflamator contribuie la deteriorarea BHE, demielinizarea și inhibarea remielinizării. Cu toate acestea, natura eterogenă a astrocitelor reactive este evidențiată de studii care arată efecte benefice și o capacitate de a opri progresia bolii și de a stimula recuperarea. Astfel, astrocitele reactive sunt, de asemenea, capabile să limiteze inflamația prin formarea unei cicatrici gliale, care împiedică infiltrarea celulelor inflamatorii în țesutul adiacent, sau prin polarizarea celulelor imune către fenotipuri antiinflamatorii. În plus, astrocitele reactive pot spori remielinizarea prin promovarea proliferării, migrației și diferențierii celulelor precursoră către OLG mielinizante. Cu toate acestea, echilibrul dintre efectele nocive și cele benefice este foarte delicat, iar efectul general al astrocitozei reactive este considerat a fi dăunător, astrocitele reactive fiind considerate în prezent ca având un rol major în progresia SM.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### Ipoteza de lucru și obiective

Laboratorul nostru a arătat anterior că RGC-32 acționează în aval de TGF- $\beta$  pentru a regla producția de constituenți ai matricei extracelulare (MEC), cum ar fi fibronectina și colagenul de tip I, IV și V în astrocite. RGC-32 interacționează cu proteina SMAD3 și reglează translocarea nucleară a acesteia. Mai mult, absența RGC-32 la șoareci ameliorează EAE în timpul fazei acute și face ca celulele T CD4<sup>+</sup> să nu se poată diferenția în celule Th17, un subset de celule T helper cu un rol crucial în inducerea EAE. Mai mult, rezultatele noastre anterioare au arătat că astrocitele din măduva spinării de la șoarecii RGC-32 knock-out (KO) au o morfologie diferită față de omologii lor normali, wild type (WT), sugerând că RGC-32 ar putea fi direct implicat în diferențierea astrocitelor și în astroglioza reactivă și, prin urmare, ar putea exercita un potențial patogen în neuroinflamație prin reglarea biologiei astrocitelor.

Prin urmare, această teză a încercat să se focalizeze mai în detaliu asupra mai multor legături observate anterior între RGC-32 și astrocitele reactive. În mod specific, teza încearcă să răspundă la întrebările referitoare la modul exact în care RGC-32 contribuie la generarea astrocitelor reactive și dacă RGC-32 are vreun efect asupra căilor moleculare asociate cu astroglioza reactivă. Mai mult, ea speculează că RGC-32 ar putea fi, de asemenea, un nou factor de reglare a generării astrocitelor în timpul dezvoltării SNC. Prin urmare, teza abordează 3 întrebări specifice:

**1. Modul în care RGC-32 reglează modificările morfologice ale astrocitelor în timpul fazei acute a EAE.**

**2. Cum afectează absența RGC-32 rețelele transcriptomice ale astrocitelor.**

**3. Dacă RGC-32 are un rol în generarea de noi astrocite și dacă RGC-32 poate fi considerat o verigă lipsă în astroliogeneză.**

Pentru a atinge aceste obiective, am efectuat 3 studii bazate pe un model de șoarece RGC-32 KO generat de laboratorul nostru. Am indus EAE la șoareci de tip sălbatic (WT) și la șoareci RGC-32 KO și apoi am folosit imunohistochimia pe măduva spinării colectată în ziua 14 (EAE acută) pentru diferiți markeri de astrocite reactive și glia radială. De asemenea, am efectuat secvențierea ARN de ultimă generație pe astrocite purificate din creierile de șoareci neonatali WT și RGC-32 KO în condiții nestimulate sau după stimularea cu TGF- $\beta$ . Diferite gene și proteine care s-au dovedit a fi reglate diferențiat de RGC-32 în experimentele de transcriptomică și array au fost validate prin utilizarea PCR în timp real și, respectiv, Western blotting.

## **Studiul 1. RGC-32 reglează generarea astrocitelor reactive în timpul fazei acute a EAE**

### **Rationament și ipoteză**

Șoarecii lipsiți de RGC-32 dezvoltă un fenotip EAE mai puțin sever în comparație cu șoarecii WT, în parte datorită unei acumulări mai reduse a infiltratului inflamator la vârful EAE (ziua 14). De asemenea, este bine cunoscut faptul că astrocitele joacă un rol important în recrutarea celulelor inflamatorii și în crearea unui mediu inflamator în măduva spinării EAE. De fapt, astrocitoza reactivă începe în timpul fazelor timpurii ale evoluției bolii și atinge maximum la vârful bolii, în paralel cu acumularea de infiltrat inflamator, în strânsă corelație cu severitatea bolii. Deoarece lipsa RGC-32 modifică morfologia astrocitelor în măduva spinării în timpul fazei acute a EAE, așa cum am descris mai sus, am emis ipoteza că RGC-32 este cumva implicat în modificările fenotipice astrocitare în timpul EAE acute și astfel ar contribui la unul din mecanismele prin care RGC-32 contribuie la patogeneză EAE. Prin urmare, acest studiu a abordat întrebarea dacă astrocitele RGC-32 KO sunt într-adevăr celule imature din punct de vedere fenotipic și dacă acest fenotip imatur este, de asemenea, prezent la șoarecii normali și reprezintă fie un proces de maturizare întârziată a progenitorilor astrocitari, fie este pur și simplu un defect de diferențiere în contextul unei neuroinflamații diminuate.

### **Materiale și metode**

Pentru acest studiu, am efectuat imunohistochimie simplă și dublă pe șoareci de control în ziua 0 și pe șoareci cu EAE în ziua 14 de ambele genotipuri (WT și RGC-32 KO) pentru proteina acidă fibrilară glială (GFAP), un marker pan-astrocitar a cărui expresie

este crescută în timpul astrogliozei reactive, vimentina și proteina de legare a acizilor grași 7 (FAPB7), două proteine prezente în progenitorii astrocitelor, Ki-67, un marker de proliferare nucleară, și factorul de creștere a țesutului conjunctiv (CTGF), o moleculă care acționează în aval de calea de semnalizare TGF- $\beta$ . Am efectuat, de asemenea, imunocitochimie pentru GFAP pe astrocitele izolate din creierul neonatal de șoarece WT și RGC-32 KO. Apoi am purificat ARN și am efectuat qPCR pe astrocite cerebrale WT și RGC-32 KO cultivate pentru a măsura nivelurile mai multor gene asociate cu MEC și pentru a compara nivelurile acestora între cele două genotipuri. Purificarea proteinelor și Western blotting au fost efectuate pentru a detecta nivelurile proteice ale mai multor factori reglați diferențiat de RGC-32 la nivel de transcripție. În cele din urmă, s-a efectuat o analiză array de factori de creștere pentru a determina nivelurile secretate ale mai multor factori de creștere între astrocitele de șoarece WT și RGC-32 KO.

### **Rezultate și discuții**

Acest studiu dovedește că, în absența RGC-32, astrocitele din măduva spinării au o densitate mai mică și prezintă un fenotip imatur asociat cu o expresie crescută a markerilor de astrocit imatur vimentină și FABP7. De asemenea, acestea prezintă un indice proliferativ mai mare decât astrocitele WT, așa cum reiese din expresia mai mare a Ki-67. Mai mult, spre deosebire de astrocitele WT, astrocitele RGC-32 KO nu sunt capabile să sufere modificări reactive la vârful bolii EAE și prezintă o inabilitate intrinsecă de a crește sinteza de GFAP. De asemenea, am arătat că, RGC-32 reglează o serie complexă de rețele moleculare legate de transducția semnalelor, expresia și secreția factorilor de creștere și remodelarea MEC. Dintre acești factori, am constatat că cei mai diferențiat exprimați sunt factorul de creștere asemănător insulinei 1 (IGF1), proteinele de legare a factorului de creștere asemănător insulinei (IGFBPs) și CTGF, expresia acestor proteine fiind scăzută reglată în jos în astrocitele lipsite de RGC-32.

## **Studiul 2. RGC-32 acționează ca un nod molecular și reglează modificările transcriptomice asociate cu dezvoltarea astrocitelor și astrocitoza reactivă**

### **Rationament și ipoteză**

Rezultatele menționate în studiul 1 indică o contribuție importantă a RGC-32 în biologia astrocitelor, aruncând o oarecare lumină asupra funcțiilor acestei proteine descrise relativ recent. După cum s-a menționat anterior, astrocitoza reactivă este considerată în prezent ca fiind un factor major în patogeneza bolilor neuroinflamatorii și încă nu avem un puzzle complet al tuturor factorilor moleculari care influențează acest proces. Din moment ce am observat deja o reglare diferențială a factorilor de creștere și a componentelor MEC folosind o serie limitată de array-uri, ipoteza noastră

este că RGC-32 poate induce modificări transcriptomice la o scară mult mai largă, având în vedere rolul său modular în multe procese fiziologice și patologice, așa cum a fost descris anterior. Prin urmare, în acest studiu, am folosit secvențierea ARN pe astrocite cerebrale izolate din pui de șoarece WT și RGC-32 KO, în condiții bazale și după stimularea cu TGF- $\beta$ , și am comparat profilul transcriptomic între cele două genotipuri.

### **Materiale și metode**

Secvențierea ARN a fost realizată din 1  $\mu$ g de ARN total. Pentru fiecare genotip și condiție (bazală și stimulată), au fost analizate două replici biologice. Calitatea ARN-ului a fost determinată de Genewiz NGS Laboratory (South Plainfield, NJ, SUA). Pipeline-ul VIPER (care implementează alignerul STAR) pe clusterul Biowulf al NIH High Performance Computing (<http://hpc.nih.gov>) a fost utilizat pentru alinieri. Am folosit apoi atât analiza limma, cât și DESEQ2 pentru expresia diferențială a genelor. Analiza ulterioară în acest studiu desemnează genele exprimate diferențial ca gene cu un nivel de cel puțin 1,5 ori mai ridicat sau mai scăzut după stimularea TGF- $\beta$  în raport cu condițiile nestimulate în fiecare genotip, sau între fiecare genotip în condiții bazale și stimulate, corespunzând la  $|\log_2 \text{-fold change}| \geq 0,6$  și o rată de descoperire falsă  $< 0,05$ , după corecția Bonferroni folosind protocolul DESEQ2. Apoi, am efectuat o analiză de îmbogățire funcțională și o analiză de conectivitate a căilor genetice utilizând diverse platforme online și servere web pentru a detecta cele mai relevante procese biologice și asociații de produse genice care au fost reglementate diferențiat de RGC-32. Apoi s-au efectuat qPCR și imunohistochimie pentru a valida unele dintre genele și proteinele individuale cele mai puternic reglate de RGC-32.

### **Rezultate și discuții**

Analiza noastră de secvențiere a ARN-ului a arătat că stimularea cu TGF- $\beta$  a astrocitelor activează, cel puțin parțial, unele dintre programele transcripționale care sunt active în timpul dezvoltării SNC și că absența RGC-32 are un impact semnificativ asupra programelor transcriptomice asociate în mod normal cu neurogeneza, dezvoltarea creierului, proiecția celulară și motilitatea celulară. Interesant este faptul că unele dintre genele care compun aceste căi ar putea fi supraexprimate în astrocitele reactive, recapitulând programele moleculare observate în mod normal în timpul dezvoltării celulare, un proces care contribuie la versatilitatea astrocitelor reactive și la remodelarea țesuturilor. Printre acele molecule care au crescut doar în astrocitele WT, am găsit mai mulți membri aparținând familiei de molecule de ghidare axonală (MGA), care cuprinde receptori, liganzi și indicii care ghidează axonii în creștere spre destinație. Aceste procese sunt esențiale pentru procesele fiziologice normale, cum ar fi creșterea axonală, migrația neuronală și sinaptogeneza. Cu toate acestea, unele dintre aceste MGA sunt, de asemenea, supraregulate ca răspuns la insultele SNC, iar astrocitele reactive sunt considerate o sursă majoră pentru sinteza lor postnatală. Experimentele ulterioare de validare au constatat că printre cele mai diferențiate MGA reglate diferențiat de către RGC-32 se numără receptorul 7 de tip A al efrinei (Epha7), proteina



Slit omolog 2 (Slit2) și plexina A1 (Plxna1), și speculăm că reglarea lor este unul dintre mecanismele moleculare prin care RGC-32 facilitează astrocitoza reactivă în timpul EAE. În plus, secvențierea noastră ARN a demonstrat, de asemenea, că lipsa RGC-32 duce la o inducție semnificativă a proteinei 1 care conține repetări WD și a domeniului FYVE (Wdfy1) și a staniocalcinei-1 (Stc1), două gene care se exprimă în mod obișnuit în celulele stem neuronale și în progenitorii astrocitelor.

### **Studiul 3. RGC-32 ca posibilă verigă lipsă în astrogliogeneză**

#### **Raționament și ipoteză**

Astrocitele derivă din precursori pluripotenți numiți celule radiale gliale. În timpul dezvoltării măduvei spinării, precursorii intermediari derivă din celulele radiale gliale în zona ventriculară și apoi migrează spre zona mantalei, unde proliferază și apoi se diferențiază în astrocite mature. Cele mai multe dintre aceste celule devin astrocite fibroase. În plus, studiul 2 a constatat că cele două gene cu nivelurile cele mai ridicate în astrocitele RGC-32 KO sunt gene exprimate în mod normal de celulele stem neuronale, și anume STC1 și WDFY1, iar unele dintre genele stimulate doar în astrocitele WT sunt implicate în astrogliogeneză. Prin urmare, am dorit să explorăm mai detaliat posibilitatea ca RGC-32 să fie necesar nu numai pentru generarea astrocitelor reactive, ci și pentru generarea astrocitelor în sine. Ca atare, acest studiu a caracterizat expresia acestor markeri *in vivo* la șoarecii adulți normali, precum și în timpul EAE, prin utilizarea experimentelor imunohistochemice. Am investigat, de asemenea, dacă RGC-32 afectează translocarea nucleară a factorului de transcripție transductor de semnal și activator de transcripție 3 (STAT3), care este esențial pentru astrogliogeneză.

#### **Materiale și metode**

Pentru acest studiu, am folosit imunohistochimie pe șoareci adulți normali (ziua 0) și șoareci cu EAE (ziua 14) pentru detectarea markerilor gliali radiali CD133 și a proteinei Homeodomain-only (HOPX), în plus față de STC1 și WDFY1. Apoi, am folosit experimente de transfecție pe astrocite primare de șobolan pentru a reduce expresia RGC-32 folosind small interfering ARN (siRNA) și Lipofectamina 3000 ca vector de transfecție. Apoi, fracțiunile nucleare și citoplasmice ale astrocitelor de șobolan transfectate au fost pregătite cu ajutorul unor kituri specializate în conformitate cu protocolul producătorului, iar probele de extracte nucleare și citoplasmice au fost prelucrate ulterior prin Western blotting pentru detectarea STAT3.

#### **Rezultate și discuții**

Acest studiu arată pentru prima dată că RGC-32 exercită un efect inhibitor asupra proteinelor STC1 și WDFY1 *in vivo*. Din cunoștințele noastre, studiul nostru este, de asemenea, primul care evaluează expresia STC1 și WDFY1 în celulele radiale gliale și astrocitele de șoarece în timpul EAE. WDFY1 este o proteină adaptoare despre care s-a

constatat că este implicată în răspunsurile imune înnăscute, dar până în prezent, puține studii au descris implicarea sa în procesele cerebrale. Cu toate acestea, există unele dovezi că WDFY1 este exprimată în celulele stem neuronale în timpul diferențierii și poate juca un rol în neurogeneză. STC1 este o glicoproteină secretată a cărei expresie este crescută în gliome și este asociată cu tumorigeneza. De asemenea, am constatat că morfologia și dinamica celulelor radiale WDFY1<sup>+</sup> și STC1<sup>+</sup> din măduva spinării a șoarecilor RGC-32 KO erau foarte asemănătoare cu cele ale celulelor CD133<sup>+</sup>. CD133 este cunoscută și sub numele de prominina-1 și este o glicoproteină transmembranară a cărei expresie se găsește la suprafața celulelor stem neuronale în timpul dezvoltării SNC și în creierul adult. Este un marker histologic cheie pentru gliome, deoarece aceste tumori exprimă o concentrație mare de celule stem neuronale.

Studiul nostru a arătat, de asemenea, că absența RGC-32 afectează în mod semnificativ numărul de celule radiale gliale HOPX<sup>+</sup> din măduva spinării la șoareci în timpul EAE acute, șoarecii RGC-32 KO prezentând mai multe celule HOPX<sup>+</sup> decât șoarecii WT. S-a constatat că HOPX este un marker fiabil al gliilor radiale, deoarece este foarte bine exprimat în timpul neurodezvoltării, precum și în creierul adult în așa-numitele nișe neurogene, cum ar fi zona subventriculară.

În cele din urmă, rezultatele noastre arată, de asemenea, că reducerea RGC-32 în astrocitele de șobolan scade translocarea nucleară a STAT3. STAT3 este o componentă critică a comutatorului gliogenic, un set de modificări transcripționale în precursorii gliogeni care activează promotorii genelor care decid soarta astrocitară a precursorilor în timpul astrogliogenezei. Prin urmare, este foarte posibil ca RGC-32 să participe la diferențierea astrocitelor încă din faza de comutare gliogenică.

## **Concluzii și contribuția științifică**

Rezultatele acestor 3 studii leagă RGC-32 de răspunsul astrocitelor în neuroinflamație și demonstrează că RGC-32 intervine de-a lungul întregii axe a astrogliizei reactive, influențând schimbări majore în rețeaua transcriptomică a astrocitelor, precum și modificări ale morfologiei astrocitelor reactive. Astfel, RGC-32 favorizează sinteza și secreția factorilor de creștere, a componentelor MEC, a MGA și a altor molecule cu proprietăți astrogliogenice și ar putea conferi un potențial patogen global astrocitelor reactive. Mai mult, datele noastre sugerează pentru prima dată că RGC-32 influențează diferențierea astrocitelor din glia radială și progenitorii de astrocite prin modularea factorilor cheie de transcripție astrogliogenică. Aceste rezultate, împreună cu descoperirile anterioare ale echipei noastre care arată că RGC-32 este necesar pentru diferențierea altor celule cu rol fundamental în neuroinflamație, cum ar fi celulele Th17, fac din RGC-32 o țintă de încredere pentru înțelegerea și, în cele din urmă, tratarea SM și a bolilor conexe.

---

Ph.D. Thesis summary

# New factors involved in reactive astrocytosis

---

Ph.D Student **Alexandru Tatomir M.D.**

---

Ph.D Mentor **Fior-Dafin Mureșanu M.D. Ph.D.**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Multiple sclerosis as the prototypical inflammatory demyelinating disorder</b>	19
1.1. Introduction	19
1.2. Epidemiology and risk factors	19
1.2.1. Vitamin D	20
1.2.2. EBV	21
1.2.3. Smoking	22
1.2.4. Adolescent obesity	23
1.2.5. Genetic susceptibility	24
1.3. Diagnosis of MS	24
1.4. The pathogenesis of MS	26
1.4.1. The role of T cells	26
1.4.2. The role of B cells	27
1.4.3. The role of macrophages and microglia	28
1.4.4. The role of astrocytes	29
1.4.5. The role of the complement system	29
1.5. The histopathological features of MS lesions	31
1.5.1. Pre-active and diffuse lesions	31
1.5.2. Active lesions	31
1.5.3. Mixed active/inactive lesions	32
1.5.4. Inactive lesions	32
1.5.5. Remyelination in MS lesions	33
<b>2. The role of astrocyte in the pathogenesis of MS</b>	35
2.1. Cellular and functional aspects of astrocytic diversity	35
2.1.1. The heterogeneity of healthy astrocytes	35
2.1.2. The normal physiology of astrocytes	36
2.1.2.1. Role in CNS development and synaptogenesis	36
2.1.2.2. Hydro-electrolytic and neurotransmitter homeostasis	36
2.1.2.3. BBB formation and blood flow regulation	36
2.1.2.4. Energy, metabolism, and neurotrophic support	37

2.2. The reactive astrocyte	37
2.2.1. The heterogeneity of reactive astrocytes	37
2.2.1.1. Proliferative vs. nonproliferative reactive astrocytes	38
2.2.1.2. A1 vs. A2 astrocytes	38
2.2.2. The deleterious effects of reactive astrogliosis	39
2.2.2.1. Destruction of the BBB	39
2.2.2.2. Recruitment of inflammatory cells	39
2.2.2.3. Neurotoxicity	40
2.2.2.4. Myelin damage and remyelination failure	41
2.2.3. The beneficial effects of reactive astrogliosis	42
2.2.3.1. Inhibition of inflammatory cells invasion into CNS	42
2.2.3.2. Antioxidative effects	43
2.2.3.3. Immunomodulatory effects	44
2.2.3.4. Remyelination and neuroprotection	44
<b>3. The pathogenic potential of Response Gene to Complement (RGC)-32</b>	47
3.1. Physiological and pathophysiological roles of RGC-32	47
3.2. RGC-32 and the immune system	47
3.3. The role of RGC-32 in MS and EAE	49
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Working hypothesis and objectives</b>	53
<b>2. General methodology</b>	55
<b>3. Study 1 - RGC-32 regulates generation of reactive astrocytes during the acute phase of EAE</b>	57
3.1. Rationale and hypothesis	57
3.2. Materials and methods	57
3.3. Results	61
3.4. Discussion	76
<b>4. Study 2 - RGC-32 acts as a hub to regulate the transcriptomic changes associated with astrocyte development and reactive astrocytosis</b>	81
4.1. Rationale and hypothesis	81
4.2. Materials and methods	81
4.3. Results	84
4.4. Discussion	100

<b>5. Study 3 - RGC-32 as a possible missing link in astrogliogenesis</b>	103
5.1. Rationale and hypothesis	103
5.2. Materials and methods	103
5.3. Results	105
5.4. Discussion	111
<b>6. Conclusions and future directions</b>	115
<b>7. Thesis originality and contributions to the field</b>	119
<b>REFERENCES</b>	121

**Keywords:** RGC-32, multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, reactive astrocytosis, GFAP, vimentin, FABP7, radial glia, astrogliogenesis, RNA next generation sequencing.

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

**Response Gene to Complement (RGC)-32** was first identified in rat oligodendrocytes (OLG) as a gene induced by sublytic C5b-9 activation. RGC-32 was later found to regulate cell cycle in several cell types, such as endothelial cells and smooth muscle cells, and to contribute to cellular processes crucial for fibrosis, angiogenesis, oncogenesis, and metastasis, including Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ )-induced epithelial-to-mesenchymal transition.

**Astrocytes** play a fundamental role in normal neuronal functioning and maintaining a healthy neural environment. Astrocytes regulate several physiological processes needed for central nervous system (CNS) homeostasis, including synaptogenesis, neurotransmitter turn-over and clearance from the synaptic space, regulation of ionic and water balance, formation and maintenance of the blood-brain barrier (BBB). Astrocytes are now recognized as critical contributors to the pathogenesis of various CNS diseases due to their capacity to undergo complex morphological and molecular changes in response to CNS damage, a process called **reactive astrocytosis**. Reactive astrocytes interact with other glial cells and inflammatory cells to coordinate the evolution of injury, either toward recovery and resolution of inflammation, or toward progression and permanent damage, in a relatively delicate balance which is region-, time- and context-dependent.

Reactive astrocytes have received particular attention as important players in the pathogenesis of **multiple sclerosis (MS)**, a chronic, autoinflammatory and demyelinating disease of the CNS and **experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)**, an MS animal model. Several studies have shown that reactive astrocytes play an

important role in disease initiation and progression through their ability to attract inflammatory cells into CNS by secreting cytokines and chemokines. In addition, reactive astrocytes produce toxic reactive nitrogen and oxygen species and this proinflammatory environment contributes to BBB damage, demyelination and inhibition of remyelination. However, the heterogeneous nature of reactive astrocytes is evidenced by studies showing beneficial effects and an ability to stop the progression of disease and to stimulate recovery. Thus, reactive astrocytes are also capable of limiting inflammation by forming a glial scar, which prevents the infiltration of inflammatory cells into adjacent tissue, or by polarizing immune cells toward anti-inflammatory phenotypes. In addition, reactive astrocytes can enhance remyelination by promoting proliferation, migration, and differentiation of precursor cells toward myelinating OLG. Nevertheless, the balance between harmful and beneficial effects is very delicate and the overall effect of reactive astrogliosis is considered to be detrimental, reactive astrocytes being now considered as major players driving MS progression.

## PERSONAL CONTRIBUTION

### Working hypothesis and objectives

Our laboratory previously showed that RGC-32 acts downstream of TGF- $\beta$  to regulate the production of extracellular matrix (ECM) constituents, such as fibronectin and collagen type I, IV, and V in astrocytes. RGC-32 interacts with the protein SMAD3 and regulates its nuclear translocation. Moreover, absence of RGC-32 in mice ameliorates EAE during the acute phase and renders CD4<sup>+</sup> T cells unable to differentiate towards Th17 cells, a subset of Th cells with a crucial role in EAE induction. Moreover, our previous results have shown that spinal cord astrocytes from RGC-32 knock-out (KO) mice have a different morphology than their WT counterparts, suggesting that RGC-32 might be directly involved in astrocytes differentiation and in reactive astrogliosis and, therefore, might exert a pathogenic potential in neuroinflammation through the regulation of astrocyte biology.

Therefore, this thesis tries to connect and complete several links previously observed between RGC-32 and reactive astrocytes. Specifically, it will try to respond to questions regarding how exactly RGC-32 contributes to the generation of reactive astrocytes, and whether RGC-32 has any effect on the molecular pathways associated with reactive astrogliosis. Moreover, it will tentatively speculate that RGC-32 might also be a new factor regulating the generation of astrocytes during CNS development. This thesis therefore addressed 3 specific questions:

**1. How RGC-32 regulates the morphological changes of astrocytes during acute EAE.**

**2. How absence of RGC-32 affects the transcriptomic networks of astrocytes.**

**3. Whether RGC-32 has a role in the generation of new astrocytes and whether RGC-32 can be considered a missing link in astrogliogenesis.**

To achieve these goals, we performed 3 studies based on an RGC-32 KO mouse model generated by our laboratory. We induced EAE in wild type (WT) and RGC-32 KO mice and then used immunohistochemistry on spinal cords collected on day 14 (acute EAE) for different reactive astrocytes and radial glia markers. We also performed next generation RNA sequencing on astrocytes purified from WT and RGC-32 KO neonatal mouse brains under unstimulated conditions or after TGF- $\beta$  stimulation. Various genes and proteins found to be differentially regulated by RGC-32 in transcriptome and array experiments were validated by using Real-Time PCR and Western blotting, respectively.

## **Study 1. RGC-32 regulates generation of reactive astrocytes during the acute phase of EAE**

### **Rationale and hypothesis**

Mice lacking RGC-32 develop a less severe EAE phenotype when compared with WT mice, in part due to a less inflammatory infiltrate accumulation at the peak of EAE (day 14). It is also well known that astrocytes play an important role in recruiting inflammatory cells and mounting an inflammatory environment in EAE spinal cords. In fact, reactive astrocytosis starts during the early phases of disease evolution and reaches its maximum at the peak of disease, in parallel with the accumulation of inflammatory infiltrate, strongly correlating with disease severity. Since a lack of RGC-32 alters astrocyte morphology in spinal cords during acute EAE as described above, we hypothesized that RGC-32 is somehow involved in astrocytic phenotypical changes during peak EAE and might be one mechanism through which the absence of RGC-32 confers an attenuated EAE disease course. Therefore, this study addressed the question whether RGC-32 KO astrocytes are indeed phenotypically immature cells and whether this immature phenotype is also present in normal mice and represents either a delayed maturation process of radial glia and astrocytes progenitors or is simply a defect of differentiation in the context of diminished neuroinflammation.

### **Materials and Methods**

For this study, we performed single and double staining immunohistochemistry on control mice on day 0 and mice with EAE on day 14 of both genotypes (WT and RGC-32 KO) for glial fibrillary acidic protein (GFAP), a pan-astrocytic marker whose expression is increased during reactive astrogliosis, vimentin and fatty acid binding protein 7 (FABP7), two proteins present in astrocytes progenitors, Ki-67, a nuclear proliferation marker, and connective tissue growth factor (CTGF), a molecule acting



downstream of TGF- $\beta$  signaling pathway. We have also performed immunocytochemistry for GFAP on WT and RGC-32 KO mouse neonatal brain astrocytes. We then purified RNA and performed cDNA synthesis and quantitative Real-Time PCR on cultured WT and RGC-32 KO brain astrocytes in order to measure the transcript levels of various factors associated with ECM and to compare their levels between the two genotypes. Protein purification and Western blotting were also performed in order to detect the protein levels of several factors found to be differentially regulated by RGC-32 at the transcript levels. Finally, a growth factor array was performed to determine the secreted levels of several growth factors between WT and RGC-32 KO mouse astrocytes.

## **Results and discussion**

This study proves that in the absence of RGC-32, spinal cord astrocytes have a lower density and display an immature phenotype associated with increased expression of the radial glia markers vimentin and FABP7. They also display a higher proliferative index than WT astrocytes as evidenced by higher expression of Ki-67. Moreover, in contrast to WT astrocytes, RGC-32 KO astrocytes are unable to undergo reactive changes at the peak of EAE disease. We have also shown that mechanistically, RGC-32 regulates a complex array of molecular networks related to signal transduction, growth factor expression and secretion, and ECM remodeling. Among these factors, we found the most differentially expressed to be insulin-like growth factor 1 (IGF1), insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs), and CTGF, with the expression of these proteins being downregulated in RGC-32-depleted astrocytes.

## **Study 2. RGC-32 acts as a hub to regulate the transcriptomic changes associated with astrocyte development and reactive astrocytosis**

### **Rationale and hypothesis**

The results mentioned in study 1 point to an important contribution of RGC-32 in astrocyte biology, shedding some light on the functions of this relatively recently described protein. As was mentioned before, reactive astrocytosis is now seen as a major driver of disease progression in neuroinflammation and we still don't have a complete puzzle of all the molecular factors influencing this process. Since we have already seen differential regulation of growth factors and ECM components using limited arrays, our hypothesis is that RGC-32 can induce transcriptomic changes in a much broader scale, given its modularity role in many physiological and pathological processes, as described previously. Therefore, in this study, we used RNA sequencing on brain astrocytes derived from WT and RGC-32 KO mouse pups, under basal conditions and after TGF- $\beta$

stimulation, and compared the transcriptomic profile between the two genotypes and between normal and stimulated conditions.

### **Materials and Methods**

Next generation RNA sequencing was performed from 1 µg of total RNA. For each genotype and condition (basal and stimulated), two biological replicates were analyzed. RNA quality was determined by Genewiz NGS Laboratory (South Plainfield, NJ, USA). The VIPER pipeline (implementing the STAR aligner) on the NIH High Performance Computing Biowulf cluster (<http://hpc.nih.gov>) was used for alignments. We then used both limma and DESEQ2 analysis for differential gene expression. Further analysis in this study designates differentially expressed genes (DEG) as genes with at least 1.5x differential-fold change - either up-regulated or down-regulated after TGF-β stimulation relative to unstimulated conditions in each genotype, or between each genotype under basal and stimulated conditions, corresponding to  $|\log_2 \text{-fold change}| \geq 0.6$  and a false discovery rate (FDR) < 0.05, after Bonferroni correction using the DESEQ2 protocol. We then performed functional enrichment analysis and connectivity analysis of gene pathways using various online platforms and web servers in order to detect the most relevant biological processes and gene product associations that were differentially regulated by RGC-32. Real-Time PCR and immunohistochemistry were then performed to validate some of the individual genes and proteins found to be the most differentially regulated by RGC-32.

### **Results and discussion**

Our RNA sequencing analysis has revealed that TGF-β stimulation of astrocytes turns on, at least partially, some of the transcriptional programs that are active during CNS development and that absence of RGC-32 significantly impacts the transcriptomic programs normally associated with neurogenesis, brain development, cell projection, and cell motility. Interestingly, some of the genes composing these pathways could be upregulated in reactive astrocytes, recapitulating molecular programs normally seen during cellular development, a process that contributes to the versatility of reactive astrocytes and tissue remodeling. Among those molecules upregulated only in WT astrocytes, we found several members belonging to the axonal guidance molecules (AGM) family, which comprises receptors, ligands, and cues that guide the growing axons toward their destination. These processes are critical for normal physiological processes such as axonal growth, neuronal migration, and synaptogenesis. However, some of these AGM are also upregulated in response to CNS insults, and reactive astrocytes are regarded as a major source for their postnatal synthesis. Subsequent validation experiments found that among the most differentially regulated AGM were ephrin type-A receptor 7 (Epha7), Slit homolog 2 protein (Slit2) and plexin A1 (Plxna1), and we speculate that their up-regulation is one of the molecular mechanisms through which RGC-32 facilitates reactive astrocytosis during EAE. In addition, our next-

generation sequencing also demonstrated that a lack of RGC-32 results in a significant induction of WD repeat and FYVE domain-containing protein 1 (Wdfy1) and stanniocalcin-1 (Stc1), two genes commonly expressed in neural stem cells and astrocyte progenitors.

### **Study 3. RGC-32 as a possible missing link in astroglialogenesis**

#### **Rationale and hypothesis**

Astrocytes derive from pluripotent precursors called radial glia. During development of the spinal cord, intermediate precursors derive from radial glia in the ventricular zone, and then migrate toward the mantle zone, where they proliferate and then differentiate into mature astrocytes. Most of these cells become fibrous astrocytes. In addition, study 2 found that the two most up-regulated genes in RGC-32 KO astrocytes are genes normally expressed by neural stem cells, namely STC1 and WDFY1, and some of the genes up-regulated only in WT astrocytes are involved in astroglialogenesis. Therefore, we wanted to explore in more detail the possibility that RGC-32 is necessary not only for the generation of reactive astrocytes, but for the generation of astrocytes *per se*. As such, this study characterized the expression of these markers *in vivo* in adult normal mice as well as during EAE, by using immunohistochemistry experiments. By using *in vitro* experiments, we also investigated whether RGC-32 affects the nuclear translocation of the transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), which is critical for astroglialogenesis.

#### **Materials and methods**

For this study, we used single staining immunohistochemistry on normal adult mice (day 0) and mice with EAE (day 14) for the detection of radial glial markers CD133 and Homeodomain-only protein (HOPX), in addition to STC1 and WDFY1. We then used transfection experiments on primary rat astrocytes to knock down RGC-32 expression using small interfering RNA (siRNA) and Lipofectamine 3000 as a transfection vector. Then, nuclear and cytoplasmic fractions of transfected rat astrocytes were prepared by using specialized kits according to manufacturer's protocol and the samples of nuclear and cytoplasmic extracts were further processed by Western blotting for the detection of STAT3.

#### **Results and discussion**

This study shows for the first time that RGC-32 exerts an inhibitory effect on both STC1 and WDFY1 proteins *in vivo*. To our knowledge, our study is also the first to evaluate the expression of STC1 and WDFY1 in mouse radial glia and astrocytes during EAE. WDFY1 is an adaptor protein found to be involved in innate immune responses but so far, few studies have described its involvement in brain processes. However, there is some evidence that WDFY1 is expressed in neural stem cells during differentiation and

may play a role in neurogenesis. STC1 is a secreted glycoprotein initially described as a hormone involved in phospho-calcic metabolism regulation. Other studies have shown that STC1 expression is augmented in gliomas and is associated with tumorigenesis. We also found that the morphology and dynamics of WDFY1<sup>+</sup> and STC1<sup>+</sup> cells in the spinal cords of RGC-32 KO mice were highly similar to those of CD133<sup>+</sup> radial glia. CD133 is also known as prominin-1 and is a transmembrane glycoprotein whose expression is found on the surface of neural stem cells during CNS development and in adult brains. It is a key histological marker for gliomas as these tumors express a high concentration of neural stem cells.

Our study has also shown that the absence of RGC-32 significantly affects the number of spinal cord HOPX<sup>+</sup> radial glia cells in mice during acute EAE, with RGC-32 KO mice displaying more HOPX<sup>+</sup> radial glia than WT mice. HOPX has been found to be a reliable radial glia marker, as it is highly expressed during neurodevelopment as well as in the adult brain in the so-called neurogenic niches, such as the subventricular zone.

Lastly, our results also show that downregulation of RGC-32 in rat astrocytes decreases the nuclear translocation of STAT3. STAT3 is a critical component of the gliogenic switch, a set of transcriptional modifications in gliogenic precursors that activate the promoters of the genes that ultimately decide the astrocytic fate of precursors during astrogliogenesis. It is therefore highly possible that RGC-32 participates in astrocyte differentiation as early as the gliogenic switch.

## **Conclusions and contributions to the field**

The results of these 3 studies link RGC-32 to astrocytes response in neuroinflammation and demonstrate that RGC-32 intervenes along the whole axis of reactive astrogliosis, influencing major changes in astrocytes transcriptomic network, as well as modifications of reactive astrocytes gross morphology. Thus, RGC-32 favors the synthesis and secretion of growth factors, ECM components, AGM, and other molecules with astrogliogenic properties and might confer an overall pathogenic potential to reactive astrocytes. Moreover, our data also suggest for the first time that RGC-32 drives the differentiation of astrocytes from radial glia and astrocyte progenitors by modulating key astrogliogenic transcription factors. These results, coupled with previous findings from our team showing that RGC-32 is necessary for the differentiation of other cells with fundamental role in neuroinflammation, such as Th17 cells, make RGC-32 a reliable target for understanding and eventually treating MS and related diseases.